CheKine™ 苹果酸含量检测试剂盒

货号: KTB1028　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

≠	**检测范围：**15.625-1000 nmol/mL		**灵敏度：**15.625 nmol/mL
	适用样本：动植物组织、细胞或细菌、血清（浆）或其他液体		
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月		

01 背景与原理

苹果酸是一种广泛存在于植物、动物及微生物体内的天然有机酸，尤其在未成熟的水果中含量丰富。作为三羧酸循环的关键中间代谢物，苹果酸在细胞能量代谢、维持氧化还原平衡以及调节细胞内 pH 值等方面发挥重要作用。此外，苹果酸在食品工业中常用作酸度调节剂和风味增强剂，在医药和化妆品领域也有广泛应用。

本试剂盒检测原理是在苹果酸脱氢酶（MDH）的催化作用下，苹果酸与氧化型辅酶Ⅰ（NAD^+）发生特异性氧化还原反应，生成草酰乙酸和还原型辅酶Ⅰ（NADH）。随后，生成的 NADH 在电子耦合试剂 1-甲氧基-5-甲基酚嗪硫酸甲酯盐（1-mPMS）的介导下，将水溶性四唑盐 WST-8 还原为橙黄色的甲臜（Formazan）产物。该产物在 450 nm 波长处具有最大吸收峰，且其生成量与样本中苹果酸的浓度呈正比。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer Ⅰ	60 mL	60×2 mL	4℃
Extraction Buffer Ⅱ	10 mL	20 mL	4℃
Reagent Ⅰ	15 mL	30 mL	4℃
Reagent Ⅱ	1.25 mL	2.5 mL	-20℃，避光保存
Reagent Ⅲ	Powder×1 vial	Powder×2 vial	-20℃，避光保存
Reagent Ⅳ	300 μL	600 μL	-20℃，避光保存
100 mM Standard	1 mL	1 mL	-20℃

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 450 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS	样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、离心机、恒温水浴锅、制冰机、超声破碎仪、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Extraction Buffer Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	未用完的试剂-20℃分装避光保存，禁止反复冻融
Working Reagent Ⅲ	临用前配制；取一支加入 1.25 mL Reagent Ⅰ充分混匀	未用完的试剂分装保存于-20℃分装避光保存 1 个月，禁止反复冻融
Reagent Ⅳ	即用型	实验过程中冰上放置，未用完的试剂-20℃避光保存
100 mM Standard	即用型；使用前平衡到室温	未用完的试剂分装保存于-20℃，禁止反复冻融；**使用前需振荡混匀**

05-1-2 标准品配制

取 10 μL 100 mM Standard，加入 90 μL Reagent Ⅰ混匀稀释，即得 10 mM Standard，按下表所示，进行下一步稀释。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品（μL）	Reagent Ⅰ（μL）	浓度（nmol/mL）
1	50 μL 10 mM Standard	450	1000
2	200 μL 1000 nmol/mL	200	500
3	200 μL 500 nmol/mL	200	250
4	200 μL 250 nmol/mL	200	125
5	200 μL 125 nmol/mL	200	62.5
6	200 μL 62.5 nmol/mL	200	31.25
7	200 μL 31.25 nmol/mL	200	15.625
空白	0	200	0

05-2 样本制备

注意：1. 推荐使用新鲜样本，样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整细胞或者分装的组织块保存在-80℃，一个月内使用。当准备好进行该项实验时，将样本从-80℃拿出后，冰上解冻。但是请注意，这可能会影响样本的稳定性，实验结果可能会低于预期。

2. Extraction Buffer 中含有使蛋白变性的成分，若按蛋白浓度计算时，需要用去离子水重新提取蛋白进行测定。

- **动植物组织**：称取约 0.1 g 组织样本，加入 1 mL Extraction Buffer Ⅰ，冰浴匀浆，12000 g，4℃离心 10 min，取 800 μL 上清液，缓慢加入 150 μL Extraction Buffer Ⅱ混匀，12000 g，4℃离心 10min，取上清液待测。
- **细胞或细菌**：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1mL Extraction Buffer Ⅰ，冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），12000 g，4℃离心 10 min，取 800 μL 上清液，缓慢加入 150 μL Extraction Buffer Ⅱ混匀，12000 g，4℃离心 10 min，取上清液待测。
- **血清（浆）等液体样本**：取 100 μL 样本，加入 1 mL Extraction Buffer Ⅰ混匀，12000 g，4℃离心 10 min，取 800 μL 上清液，缓慢加入 150 μL Extraction Buffer Ⅱ混匀，12000 g，4℃离心 10 min，取上清液待测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 450 nm。
2. **工作液的配制：**

测定工作液：每个测定孔/空白孔/标准孔准备 90 μL，现配现用：吸取 9 μL Reagent Ⅱ，9 μL Working Reagent Ⅲ，2 μL Reagent Ⅳ，70 μL Reagent Ⅰ，配制好的工作液冰上放置，尽量避光，使用前需混匀。

对照工作液：每个对照孔准备 90 μL 对照工作液，现配现用：吸取 9 μL Reagent Ⅱ，9 μL Working Reagent Ⅲ，72 μL Reagent Ⅰ，配制好的工作液冰上放置，尽量避光，使用前需混匀。样品较多时可以使用排枪滴加工作液。

3. **检测体系配制**：每个测定孔需设一个对照孔，空白孔和标准孔只用测 1-2 次。在 96 孔板中按照如下方式操作：

试剂	测定孔（μL）	对照孔（μL）	空白孔（μL）	标准孔（μL）
样本	10	10	0	0
Standard	0	0	0	10
Reagent Ⅰ	0	0	10	0
测定工作液	90	0	90	90
对照工作液	0	90	0	0

4. **吸光度检测：**混匀后，37℃避光孵育准确反应 30 min，测定 450 nm 处吸光度，分别记为 $A_{测定}$、$A_{对照}$、$A_{空白}$、$A_{标准}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$、$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线。将$\Delta A_{测定}$代入方程得到 y 值（nmol/mL）。

3. 样本苹果酸含量计算

- 按样本蛋白浓度计算：

苹果酸（nmol/mg prot)=$V_{样}\times y\div(V_{样}\times Cpr)\times n$=**y÷Cpr×n**

- 按样本质量计算：

苹果酸（nmol/g)=$(V_{上清}+V_{提Ⅱ})\times y\div(W\times V_{上清}\div V_{提Ⅰ})\times n$=**1.1875y÷W×n**

- 按细胞或细菌数量计算：

苹果酸（nmol/10^6)=$(V_{上清}+V_{提Ⅱ})\times y\div(N\times V_{上清}\div V_{提Ⅰ})\times n$=**1.1875y÷N×n**

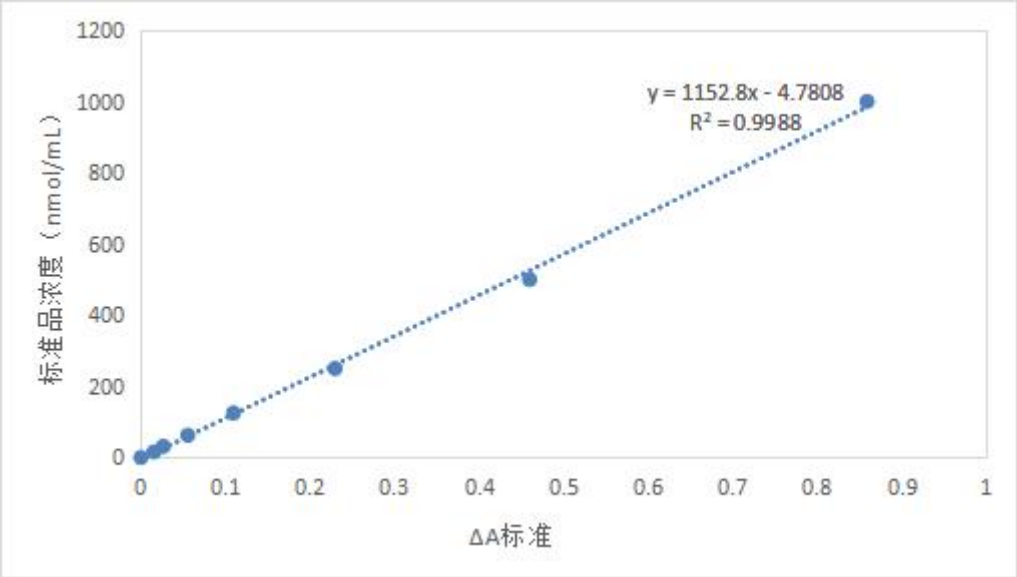
- 按样本体积计算：

苹果酸（nmol/mL)=$(V_{上清}+V_{提Ⅱ})\times y\div[V_{液体}\times V_{上清}\div(V_{液体}+V_{提Ⅰ})]\times n$=**13.0625y×n**

$V_{样}$：加入反应体系中样本体积，0.01 mL；$V_{上清}$：提取时上清的体积，0.8 mL；$V_{提Ⅰ}$：加入 Extraction Buffer Ⅰ的体积，1 mL；$V_{提Ⅱ}$：加入 Extraction Buffer Ⅱ的体积，0.15 mL；$V_{液体}$：液体样本的体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞数量，以 10^6 为单位（例如细菌数量为 5×10^6，N=5）；n：样本稀释倍数。

07 结果展示

典型标准曲线：y=1152.8x-4.7808，R^2=0.9988



示例-1：取 0.1103 g 兔肝，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$=0.295-0.091=0.204，代入标准曲线，计算 y=230.390。按样本质量计算得：苹果酸 (nmol/g)=1.1875y÷W×n=2480.40 nmol/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

如果样本的$\Delta A_{测定}$高于 0.9，样本可用 Reagent Ⅰ进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。如果样本的$\Delta A_{测定}$低于 0.015，可提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1241	CheKine™ α-酮戊二酸（α-KG）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1230	CheKine™ 琥珀酸脱氢酶（SDH）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1023	CheKine™ 柠檬酸合酶（CS）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1121	CheKine™ 丙酮酸（PA）含量检测试剂盒（微量法）

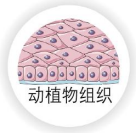
CheKine™ 苹果酸含量检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1028）

样本处理



取100 μL样本，加入1 mL Extraction Buffer Ⅰ混匀



1 mL Extraction Buffer Ⅰ冰浴研磨匀浆





收集清洗的细胞或细菌 1 mL Extraction Buffer Ⅰ冰浴超声破碎5 min（功率20%或200 W，超声3 s，间隔7 s，重复30次）



12000 g，4℃离心10 min，取上清



取800μL上清液，缓慢加入150 μL Extraction Buffer Ⅱ混匀，12000 g，4℃离心10min，取上清液待测

体系配置

测定工作液：每个测定孔/空白孔/标准孔准备90 μL，现配现用：吸取9 μL Reagent Ⅱ，9 μL Working Reagent Ⅲ，2 μL Reagent Ⅳ，70 μL Reagent Ⅰ，配制好的工作液冰上放置，尽量避光，使用前需混匀。

对照工作液：每个对照孔准备90 μL对照工作液，现配现用：吸取9 μL Reagent Ⅱ，9 μL Working Reagent Ⅲ，72 μL Reagent Ⅰ，配制好的工作液冰上放置，尽量避光，使用前需混匀。

标准品配制



样本 10 μL 测定工作液 90 μL



样本 10 μL 对照工作液 90 μL



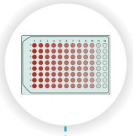
Reagent Ⅰ 10 μL 测定工作液 90 μL



Standard 10 μL 测定工作液 90 μL

混匀后，37℃孵育30 min

数据检测



测定450 nm吸光度
结果计算

V1.0